云 南 植 物 研 究 7(2):187—194, 1985
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔甜味蛋白的研究

Ⅲ.在种子中储存的位点和状态*

胡 忠 梁汉兴 刘小烛

(中国科学院昆明植物研究所)

提要 甜蛋白 mabinlin 是马槟榔 (*Capparis masaikai* Lěvl.)种子的主要储存蛋白。它位于胚轴细胞的蛋白体中，其含量为蛋白体总蛋白的90%。圆形蛋白体直径约2—10 μm，内含许多球粒体 (globoid)，但无类晶体 (crystalloid)。作为一种强碱性清蛋白，甜蛋白与一种强酸性化合物2-羟乙基葡硫甙磺酸 (2-hydroxy-ethyl-glucosinolate) 结合为可溶性盐，组成蛋白体的衬质 (matrix)。衬质中还有酸性磷酸酯酶。球粒体无一定大小，主要含植酸钾盐。当种子或种子脱脂干粉在水中匀浆时，大部分甜蛋白与植酸结合为沉淀而不能被提取。但甜蛋白-植酸复合物溶于大于0.5*N*的氯化钠溶液。这容易引起以为种子主要储存蛋白是球蛋白的假象。在水浸泡的完整种子中，部分甜蛋白从蛋白体中渗出，部分与植酸结合而后逐步释放，受到进一步降解。

关键词 甜蛋白；蛋白体

自从 Osborne 等人1924年发表关于植物蛋白的文献以来，对植物种子尤其是作物种子的蛋白已作了大量研究。一般认为，种子储存蛋白是非水溶性类型，例如豆科植物种子的球蛋白，禾谷类种子的谷蛋白和醇溶谷蛋白；清蛋白则是代谢性蛋白[3、6]。然而 Youle 等 (1978) 认为清蛋白也可能是储存蛋白，他们报告蓖麻种子蛋白体中一种清蛋白占40%[9]。我们曾报告马槟榔种子碱性清蛋白具有甜味，是种子的主要蛋白成分[1]。但是，用水却难以自种子或种子脱脂干粉中提取这种蛋白。这表明它在细胞内处于某种特殊状态。如此大量的强碱性清蛋白以何种状态储存于种子中，这是颇有意义的问题。我们结合形态学和生物化学分析方法对此进行了研究，证明马槟榔甜蛋白储存于蛋白体中，它与一种强酸性的葡糖硫甙磺酸成为可溶性盐构成蛋白体的衬质。蛋白体富有以植酸为主要成分的球粒体 (globoid) 结构。当用水抽提种子脱脂干粉时，甜蛋白与植酸结合为难溶的复合物。本文报告这些试验工作。

材 料 和 方 法

1.材料 马槟榔成熟果实于1982年9月采集，在25°C保温5天，剥去软化的果肉，

本文于1984年11月14日收到
*本研究项目受国家科委资助。本文图3实验由徐如娟、叶德和丁鸣所做，特此致谢。

干燥的种子在5°C冰箱中存放。取用时去种子外壳，必要时将种仁磨细，用石油醚（30—60°C）脱脂得脱脂干粉。

2.细胞和蛋白体的形态观察　干种子用蒸馏水在8°C浸泡12小时，去壳，用乙醇：冰醋酸混合液（3：1 V/V）固定24小时。经酒精系列脱水后，用二甲苯脱脂透明，石蜡包埋，切片，厚度5—12 μm。切片先经PAS反应，查明细胞中无多糖颗粒。切片另经pH 2.2条件下1%固绿染色，做成永久制片。用光学显微镜观察，含蛋白质的颗粒呈蓝色。

3.蛋白体和球粒体的分离　去壳干种子磨成细粉，过100目筛，用20倍量石油醚脱脂二次，粉末悬于石油醚，过100μ孔径的尼龙网，滤液放置，除去太细悬浮颗粒，离心收集蛋白体部分，干燥，保存于冰箱。用马槟榔种子油为介质显微观察蛋白体形态。试验证明，马槟榔的蛋白体膜在60%蔗糖中极易破裂，在加有四氯化碳或甘油的介质中6小时以上，膜结构亦被破坏。因此蛋白体无法应用上述介质密度梯度离心分离。

将蛋白体干粉用60%—50%丙酮水溶液浸提，除去蛋白体的衬质，得到的不溶物主要是球粒体，干燥后于低温保存。这样制备的球粒体制品还保留有细胞壁等残渣。在水溶液中马槟榔球粒体结构完全破坏。这与文献中报道的其他球粒体不同[4]。

4.酸性磷酸酯酶的细胞化学定位　干种仁在8°C用水浸泡12小时，徒手切片。为了较好保存蛋白体膜，参照Mettler等（1979）方法固定[5]，切片置于含2.5%戊二醛、2.5%水和95%甘油的介质中，然后逐级转到40%甘油、2%戊二醛的0.05 *M*醋酸(pH 5）缓冲液的介质中，最后转到含0.25 *M* 蔗糖、2%戊二醛介质中固定。用缓冲液冲洗后，切片置于0.05 *M* 醋酸缓冲液（pH 5）、0.12%醋酸铅和0.1%β-甘油磷酸钠中反应。对照切片置于没有甘油磷酸钠的介质中。在25°C保温6—12小时后，经缓冲液冲洗，置于硫化铵溶液1小时，显微观察。显棕黑色沉淀的是酸性磷酸脂酶的定位区。

5.蛋白质的的定性和定量　用SDS-聚丙烯酰胺垂直板电泳分析样品的蛋白质成分[1]。胶浓度15%，Tris-盐酸甘氨酸缓冲系统，考马氏亮兰染色。

为了蛋白组分定量，蛋白样品通过CM-纤维素柱分离，测量各分离组分的A 280 nm值，根据各组分蛋白的吸收常数计算为蛋白质毫克数，甜蛋白MaⅠ、MaⅡ和蛋白组分b的$E_{1cm}^{1\%}$ 280 nm值分别为6.55，8.35和11.1[1]。

6.植酸的定量　用二种方法测定植酸。一是根据Young（1936）[10]，基于植酸分子的磷酸根与Fe^{+++}结合量计算出植酸量。二是根据波钦诺克（1976）[2]，基于用钼兰比色法测定样品经消化释放的磷酸根量来计算植酸量。对于分离的植酸溶液，二种测定的结果一致。测定球粒体中的植酸量时，先用0.2 *N* 盐酸提取出植酸，由于提取液中有甜蛋白存在，用Fe^{+++}结合法测定值显著偏低，只能用定磷法。

7.葡萄糖硫甙磺酸的提取　蛋白体用50%丙酮水溶液提取，提取液通过CM-纤维素柱，甜蛋白被交换留在柱上。流出液通过强酸性离子交换树脂柱（HCO_3-型），硫甙磺酸被交换留在柱上，用1 *N* 碳酸氢钠洗脱，收集227 nm有强吸收的组分，减压蒸干。用甲醇提取硫甙磺酸钠盐。溶于水，通过强碱性离子交换树脂（H^+型）除去钠离子，蒸干即得硫甙磺酸。该化合物以酸状态时不稳定。其结构式如下，结构式测定见另

文。

$$HOCH_2—CH_2—C\begin{cases}S—C_6H_{11}O_5\\N—OSO_2OH\end{cases}$$

8.无机阳离子分析　80 mg 样品加 2 ml 70%的高氯酸在电炉上消化至清亮，重蒸水定容到 5 ml，用原子吸收光谱法测 K、Na、Ca、Mg 含量。

结　果　与　分　析

1.蛋白体形态　马槟榔种子呈扁螺旋形，胚位于中央，外周是肥大的胚轴。为贮存油和蛋白质的器官（图版Ⅰ—1）。用 PAS 染色证明细胞中无多糖颗粒。经二甲苯脱脂后的细胞中充满大量蛋白体（图版Ⅰ—2）。蛋白体圆形，直径 2—10 μm，每一细胞中有数十个。蛋白体内含许多球粒体，球粒体大小变化较大，不着色（图版Ⅰ—3）。蛋白体内未见有类晶体结构（crystalloid），这种结构是累积球蛋白的。

离体的蛋白体与细胞内蛋白体在形态上相同（图版Ⅰ—5）。经60%丙酮提取除去衬质所分离的球粒体呈圆形，大小变化很大。当制片放置较久时，有的球粒体更大，是若干个合并所致（图版Ⅰ—6）。这表明球粒体无固定外膜，内容物也不是不溶于水的沉淀。

在浸水较长的种子里，蛋白体形态有明显变化。蛋白体膜虽显见，但一部分蛋白质已经透出于细胞间隙。蛋白体内一部分蛋白则与球粒体结合为一团，出现了空泡（图版Ⅰ—4）。这种变化的化学基础见下节。

2.蛋白体衬质的化学组成　用50%丙酮水溶液提取蛋白体制品，可被提取物质占干重的70%，其他30%为球粒体制品。衬质中蛋白质的组分见图 1，最大组分为甜蛋白 MaⅠ和MaⅡ（d 和 c 带），其次为组分 b，其他组分均较小，组分 a，e 可能是非蛋白体蛋白混入。定量测定结果见表 1。非甜蛋白的含量在用水、50%丙酮和 1 *N* NaCl 提取时差异不大，均较低。甜蛋白量则差异很大。用水提取时，球粒体完全破坏，甜蛋白与球粒体的植酸结合为难溶复合物而大部分不能被50%丙酮提取，用 1 *N* NaCl 为溶剂时，球粒体也完全破坏，植酸同样被提取，但不能与甜蛋白形成沉淀。当提取液透析时，盐浓度降低，植酸与甜蛋白结合形成沉淀析出，表 1 此项中的甜蛋白量即是从复合物的分析结果所得。因此50%丙酮提取所得值比较接近于衬质成分实际值。根据这一结果，蛋白质含量为衬质干重的37.1%，甜蛋白占蛋白总量的90%左右。蛋白质中未检出球蛋白。

图版Ⅰ—7、8显示酸性磷酸酶定位于蛋白体的衬质里，即使样品制作时，由于在缓冲水溶液浸泡，蛋白体形态变化，部分甜蛋白渗出，该酶仍在衬质部分。初步试验证明，这种酶是图 1 显示的蛋白组分 b。

蛋白体的50%丙酮提取液中，除碱性的甜蛋白外，分离出强酸性的 2-羟乙基葡萄糖硫甙磺酸。其含量为蛋白体干重的4.2%，或衬质重量的 6 %。这表明，强碱性的甜蛋白大部分是和葡糖硫甙磺酸结合为可溶性盐存在于衬质中。

3.球粒体的化学组成　由表 2 分析结果，用0.2*N*盐酸提取球粒体制品时，有35.2%

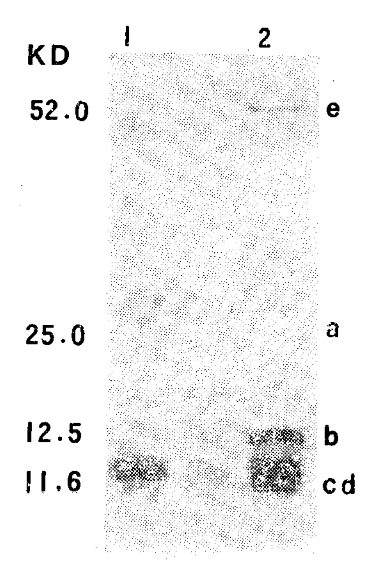


图1. 蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳谱。
样品：1.蛋白质-植酸复合物，2.蛋白体制品的水提出物。组分 cd 为甜蛋白。左侧数字是分子量(KD)。

Fig. 1 Pattern of protein separation on SDS-PAGE. Samples: 1. The protein—phytic acid complex, 2. the aqueous extract of protein bodies preparation. Bands cd are the sweet protein. Numeral values are molecular weight (KD)。

表1. 蛋白体制品中蛋白质成分及其含量(1)

Table 1. Components of protein extracted from the protein body preparation and their content (mg/g) (1)

溶剂 Solvent / 成分 Components	水 Water	50%丙酮 50% Acetone	1 N NaCl
甜蛋白(c, d) Sweet protein	61.7	248.5	226.3
非甜蛋白(a, d) Non-sweet protein	13.2	12.8	17.3

注：（1）含量分别以用三种不同溶剂从每克制品中提取的蛋白质毫克数表示。
Note：（1）content was represeoted by the mg of protein extracted from per gram of the preparation with three different solvent respectively.

表2. 球粒体制品的主要化学成份

Table 2. Constituents of globoid isolated

成 分 Constituents	含 量 Content (%)
蛋白质 Protein	19.2
植 酸 Phytic acid	32.2
无机阳离子 Metal elements	2.5
0.2N 盐酸不溶物 0.2N HCl insoluble	35.2

的不溶物，这主要是该制品不纯，含有细胞壁等碎片。球粒体主要成分是植酸。无机阳离子中 Mg 1.06%，K 1.21%，Ca 0.17%，Na 0.07%，主要是K和 Mg 离子；总量为2.51%，含量不高。此外尚有较多蛋白质，主要是甜蛋白。这一结果表明，球粒体中的植酸主要是以可溶性状态存在的，形成 Ca、Mg 盐沉淀不是主要的。可能球粒体本身无固定外膜，只是在介面上与甜蛋白形成复合物而与衬质隔开。当用水浸泡时，球粒体破坏，植酸与衬质中甜蛋白相结合。当用50%丙酮浸泡时，多数球粒体保持其形态，部分与甜蛋白结合，因此球粒体制品中甜蛋白含量较高。

4.甜蛋白—植酸复合物分析　用 1 N NaCl 溶液浸提蛋白体干粉，提取液对水透析脱盐，甜蛋白与植酸结合形成沉淀析出。该复合物难溶于水，但大部分可溶于浓度大于 0.5N 的盐溶液，或 pH＜2 的酸溶液（图 2）。

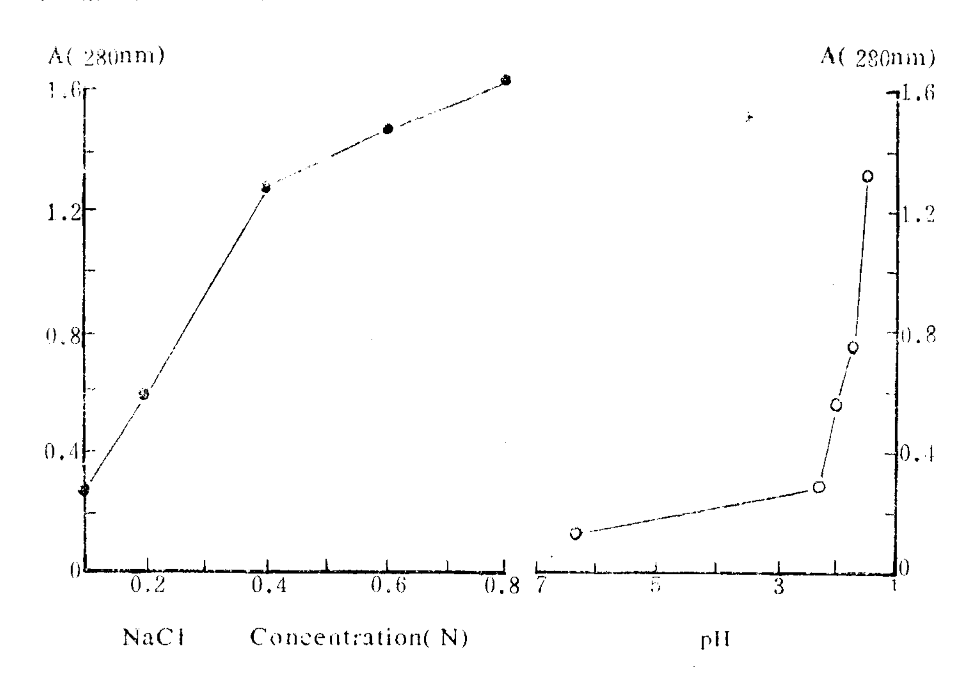


图2. 甜蛋白-植酸复合物在不同盐浓度和不同 pH 条件下的溶解性　10毫克复合物干粉加 4 ml 溶剂，20℃，混合物离心，上清液在280 nm 波长的吸收值表示溶解的蛋白质量。在图中各组上清液的盐浓度在测定光吸收前均调到 0.8N。右图溶液 pH 用 1 NHCl 调节。

Fig. 2　Solubility of sweet protein-phytic acid complex in solvent with different salt concentrations and different pH. 10 mg dry powder of the complex was added in 4 ml solvent at 20℃, and the mixture was centrifuged. The absorbance of suppernatant at 280 nm presented the quantity of the solubilized protein. The NaCl concentration of suppernatants were all adjusted to 0.8N before absorbance determination (in left part of the Fig).

将该复合物用 pH 2 的0.4N氯化钠溶液溶解，通过 CM-纤维素层析柱，甜蛋白被交换留在柱上，其他蛋白和植酸流出。分析结果证明，蛋白质中绝大部分是甜蛋白 Ma Ⅰ，还有少量图 1 电泳谱上的组分 e。在复合物中植酸与甜蛋白的分子数比为4.1：1。

5.种子浸泡过程中甜蛋白状态的变化　根据表3试验结果，干种子脱脂干粉用50%丙酮水溶液提取甜蛋白的得率很高，达脱脂干粉的14%，这表明甜蛋白在体内并未与植酸

结合。但用 1 N NaCl 再提取残渣，仍可得部分甜蛋白，可见仍有部分甜蛋白在50％丙酮提取时与植酸结合而不能提出。由此结果看来，脱脂种子的甜蛋白含量不低于18％。

种子脱脂干粉经水浸泡匀浆30分钟，只有很小部分甜蛋白溶于水，绝大部分甜蛋白与植酸结合，用50％丙酮不能提取出，继用 1 N 氯化钠即可将大部甜蛋白植酸复合物提取（表 3）。

表3. 用水浸泡种子或种子的脱脂干粉对甜蛋白 Ma Ⅰ 和 Ma Ⅱ 提取得率的影响(1)

Table 3. Influence of soaking seeds or the de-lipid seed powder in water on the extraction yield of the sweet protein Ma Ⅰ and Ma Ⅱ

材料和处理 Materials and treatment	用50％丙酮提取(2) Extraction with 50% acetone			用 1 N 氯化钠提取 Extraction with 1 N NaCl		
	Ma Ⅰ	Ma Ⅱ	Total	Ma Ⅰ	Ma Ⅱ	Total
干种子脱脂干粉 De-lipid powder of dry seeds	124.0	15.2	139.2	34.9	2.6	37.5
种子脱脂干粉经水浸泡30分 De-lipid powder soaked for 30'	0	0	0	88.4	6.6	95.0
干种子经水浸泡后的脱脂干粉 De-lipid powder of seeds soaked for 20 hr.	43.3	16.2	59.5	69.7	4.9	69.6

注：（1）得率以自每克种子脱脂干粉所提取甜蛋白毫克数表示

（2）先用50％丙酮提取，继用 1 N 氯化钠提取

Note:（1）Yield is the sweet protein(mg) extracted from one gram of dry de-lipid seed powder

（2）First extraction with 50% acetone, then with 1 N NaCl in sequence.

完整种子在室温下用水浸泡20小时，与脱脂干粉不同，将近一半的甜蛋白可用50％丙酮提取（表 3），显然是因为细胞结构的保持减少了甜蛋白和植酸的结合。从种子浸泡过程中非结合态甜蛋白量的动态变化来看（图 3），结合的速度随浸泡温度增高而加速。在 8 °C浸泡时大部分甜蛋白保持非结合态。图 3 实验中另一个值得注意的结果是，在低温条件下随着浸泡时间延长超过30小时，非结合态甜蛋白逐渐增加并在80小时时达到初始最大值。这一现象可能与图版 Ⅰ — 4 显示的结果一致，在低温下，较多的甜蛋白可自蛋白体中透出而避免与植酸结合。至于图 3 高温条件下非结合态甜蛋白也随浸泡时间而增加，可能解释为由于存在在蛋白体衬质中的酸性磷脂酶的作用，植酸逐渐被分解，甜蛋白被释放出来。

讨　论

试验和观察结果已证明，马槟榔甜蛋白是马槟榔种子主要的，甚至可以说是唯一的储存蛋白。以清蛋白为种子主要储存蛋白，这种情况文献中尚未见报道[7]。马槟榔种

子的实例说明，利用植物种子大量生产清蛋白是可能的。

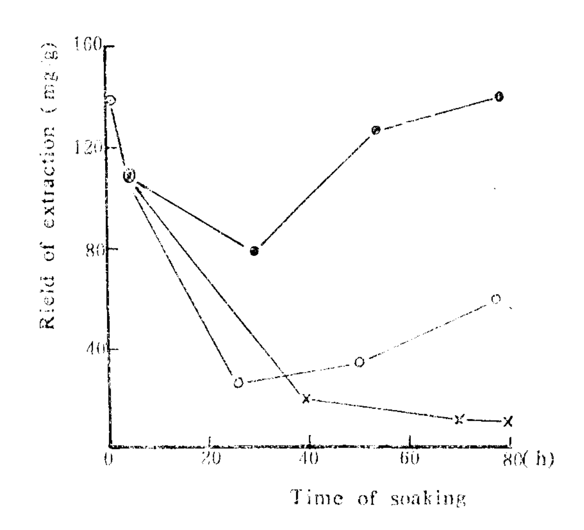


图3. 不同温度下浸泡种子过程中非结合态甜蛋白的动态变化。非结合态甜蛋白是用50%丙酮水溶液自每克干种仁所提取的甜蛋白量毫克数来表示。浸泡温度 8 ℃ (—·—)，20℃ (—×—)，35℃ (—o—)。

Fig. 3 Dynamic changes of non-binding sweet protein during the soaking of dehulled seeds at different temperature. The quantity of the non-binding sweet protein is presented by the yield of the sweet protein (mg) extracted from per gram of seed meal with 50% aqueous acetone. Temperature 8℃ (—·—), 20℃ (—×—), 35℃ (—o—).

与甜蛋白共存于蛋白体衬质中的还有葡糖硫甙磺酸。它可能起 pH 缓冲作用。Raab 等 (1975)曾报告自油菜种子中分离出分子量10000—16000 的强碱性清蛋白[8]，油菜种子是富含葡糖硫甙磺酸的。进一步分析十字花科植物种子的蛋白成分将有助于确定碱性清蛋白的累积是否与葡糖硫甙磺酸的累积之间有必然联系。

马槟榔蛋白体另一特点是内含数量很多的球粒体，它的数量和大小是可变的，主要由可溶性的植酸组成，可能由它与甜蛋白在球粒体表面形成沉淀膜，同衬质隔开，在衬质中有植酸酶。蛋白体中富含植酸-植酸酶系统，可能与种子发芽过程中逐步利用甜蛋白有关。

参 考 文 献

〔1〕 胡忠、彭丽萍、何敏，1985：马槟榔甜味蛋白的研究Ⅱ. 甜蛋白Ⅱ和甜蛋白Ⅰ的比较。云南植物研究，7(1)：1—10。

〔2〕 波钦诺克，X. H.（荆家海等译），1981：植物生物化学分析方法，植酸磷的测定。第312页，科学出版社。

〔3〕 Boulter, D. and E. Derbyshire, 1978: The general properties, classification and distribution of plant proteins. In: Plant proteins, ed. by G. Norton. Butterworths, London.

〔4〕 Lui, NST. and AM. Altschul, 1967: Isolation of globoids from cottonseed aleurone grains. *Arch. Biochem. Biophys.*, 121:678—84.

〔5〕 Mettler, IJ., and H. Beevers, 1979: Isolation and Characterization of the protein body membrane of castor bean. *Plant Physiol.*, 64:506—11.

〔6〕 Miege, MN., 1982: Protein types and distribution. In: Encyclopedia of plant physiology, New series Vol. 14A, Nucleic acids and proteins in plant Ⅰ, ed. by D. Boulter and B. Parthier, Springer-verlag Berlin.

〔7〕 Pernollet, JC., 1978: Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*, 17:1473—80.

〔8〕 Raab, B and KD. Schwenke, 1975: Isolation and characterization of the albumins from the seeds

of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and rape (*Brassica napus* L.). *Nahrung*, 19:829—33.

〔9〕 Youle, RJ. and AHC. Huang, 1978: Albumin storage protein in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.*, 61:13—16.

〔10〕 Young, L., 1936: The determination of phytic acid. *Biochem.*, 30: 252—57.

STUDIES ON MABINLIN, THE SWEET PROTEIN FROM SEEDS OF CAPPARIS MASAIKAI III. STORAGE SITE AND STATE

Hu Zhong, Liang Hanxin and Lu Xiaozhu

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

Abstract The sweet protein (mabinlin) was showed to be the major storage protein of *Capparis masaikai* Lévl. seeds. It located in protein bodies of embryonic axis cells and accounted for about 90% of their total protein. The round protein body was 2—10 μm in size and had inclusions of globoids but no crystalloid. As a very basic albumin, the sweet protein accumulated in the matrix of protein bodies in combination with a very acidic compound 2-hydroxyl-ethyl-glucosinolate. In matrix also located the acid phosphatase. Globoids were not rigid in size, and were composed mainly of the K salt of phytic acid. When seeds or the de-lipid powder of seeds were homogenized in water, most of the sweet protein could not be extracted because of being precipitated in combining with phytic acid. However, the sweet protein-phytic acid complex was dissolved in >0.5*N* NaCl. This may lead to a false impression that the major storage protein seems to be a globulin. In intact seeds soaked in water, part of sweet protein permeated out of protein bodies, and part combined with phytic acid, which would release slowly and undergo further degradation.

Key words Sweet protein; Protein body

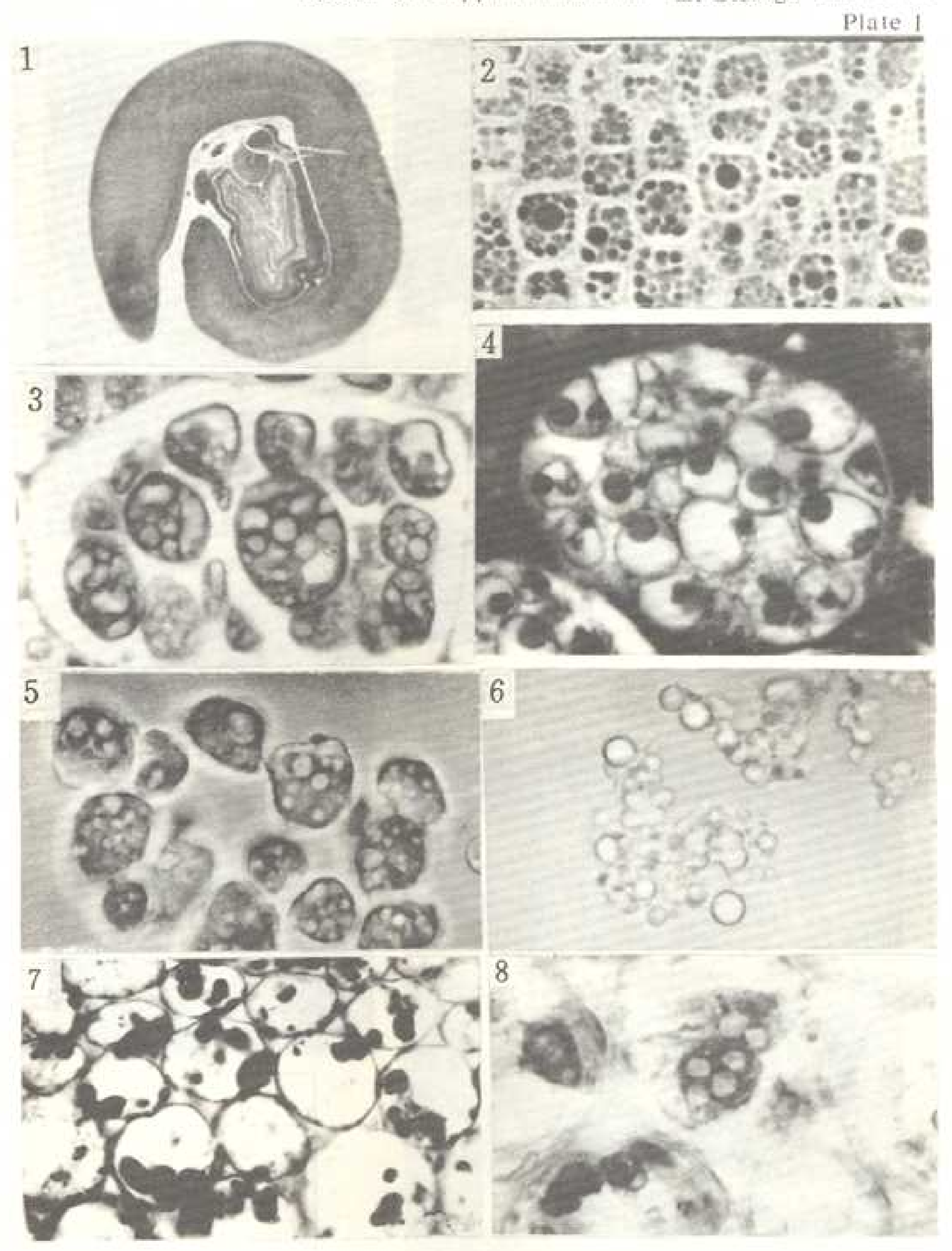
Explanation of The Plate

1. Longitudinal section of the seed of *Capparis masaikai*, Showing the storage organ hypocotyl surronding the embryo ×4. 2. Numerous protein bodies in cells of hypocotyl. ×250 3. Protein bodies in a cell and the unstained globoids in protein bodies. ×1500 4. In a sample soaked for a longer time at 8℃, part of protein permeated out of protein bodies, matrix and globoid combined, vacuole formed. ×1500 5. Isolated protein bodies. 6. Isolated globoids. ×1500 7. Location of acid phosphatase (phytase) in protein bodies. ×450 8. Location of acid phosphatase in matrix of protein body. ×1000

胡忠等：马槟榔甜味蛋白的研究Ⅲ、在种子中储存的位点和状态　　　图版 Ⅰ

Hu Zhong et al.: Studies on Mabinlin, the Sweet Protein from Seeds of *Capparis masaikai* Ⅲ. Storage and State

Plate Ⅰ



1.马槟榔种子纵切面，示主要储存器官下胚轴。×4。2.下胚轴细胞中大量的蛋白体。×250。3.一个细胞中的蛋白体及蛋白体中不被染色的球粒体。×1500。4.在8℃浸泡较多时间的样品中，蛋白体中部的蛋白质外渗，衬质和球粒体融合，空泡形成。×1500。5.分离的蛋白体。×1500。6.分离的球粒体。×1500。7.酸性磷酸脂酶定位于蛋白体中。×450。8.酸性磷酸脂酶定位于蛋白体的衬质里。×1000